

Rec'd PCT/PTO 22 FEB 2005

PCT/EP03/09355

**BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP03/9355

REC'D 16 JAN 2004

WIPO PCT

EPO-BERLIN

18-12-2003

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

102 38 922.5

**Anmeldetag:**

22. August 2002

**Anmelder/Inhaber:**

Universitätsklinikum Charité Medizinische Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin/DE

**Bezeichnung:**

Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im Zu-  
sammenhang mit Transplantat-Reaktionen

**IPC:**

C 12 N, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. September 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Ebert

5

**ANWALTSKANZLEI**  
**Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider**  
Patente Marken Design Lizenzen

10

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

**Patentanwälte**  
**European Patent and Trademark Attorneys\***

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.\*  
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.<sup>3</sup>  
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.<sup>2</sup>  
Henry Schneider, Dipl.-Ing.\*  
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.<sup>1</sup>  
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.<sup>1</sup>  
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.\*  
Dorit Rasch, Dipl.-Chem.\*  
Dr. Sven Lange, Dipl.-Biologe<sup>2</sup>

**Rechtsanwalt**

Jörg K. Grzam

**Schützenstraße 15-17**  
**D-10117 Berlin**

Tel.: 030/206230 / 030/264 13 30  
Fax: 030/264 18 38

office@berlin-patent.net  
www.berlin-patent.net

Unser Zeich./our reference  
**P153902DE-La**  
Datum/date  
Berlin, 22. August 2002

45

Universitätsklinikum Charité  
Medizinische Fakultät der Humboldt-  
Universität zu Berlin  
Schumannstraße 20/21  
10117 Berlin

50

---

**Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im  
Zusammenhang mit Transplantat-Reaktionen**

---

55

5

---

## Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit Transplantat-Reaktionen

---

10

### Beschreibung

20

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle als Immunmarker zur Detektion von Transplantat-Reaktionen, ein Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen sowie die Verwendung von Immunmarkern zur medizinischen Prophylaxe, klinischen Verlaufskontrolle, Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie im Zusammenhang mit Zell-, Gewebe- bzw. Organtransplantationen, wobei Transplantat-Reaktionen eine Toleranz, eine Rejektionskrise oder eine Abstoßung sein können.

30

Für eine erfolgreiche Organtransplantation ist es notwendig, dass das Spenderorgan histologisch möglichst weitgehend mit dem Empfängerewebe übereinstimmt. Diese Übereinstimmung wird unter anderem durch das HLA-System (Abk. für (engl.) human leucocyte antigen) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein komplexes System von Gewebean antigenen, die auf fast allen Zellen vorkommen. Dieses System spielt eine wichtige physiologische Rolle bei immunologischen Abwehrreaktionen (Erkennung von „Selbst“ und „Nichtselbst“). Vor jeder Transplantation wird deshalb eine so genannte Gewebetypisierung bei Organspender und -

5 empfänger vorgenommen, um eine möglichst weitgehende HLA-Kompatibilität zu gewähren.

Aufgrund des extremen genetischen Polymorphismus existiert eine außerordentlich große Anzahl verschiedener HLA-Moleküle. Eine vollständige Übereinstimmung wird ausschließlich  
10 bei eineiigen Zwillingen beobachtet, ansonsten sind HLA-Moleküle für jeden Menschen einzigartig.

Problematisch ist jedoch, dass trotz einer weitgehenden HLA-Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender eine Abstoßungsreaktion gegen das transplantierte Organ nicht  
15 ausgeschlossen werden kann. Trotz dieser Schwierigkeiten stellt die Transplantation die Therapie der Wahl bei irreversiblen Organversagen dar.

Der ansteigende Bedarf an Organtransplantationen zusammen mit dem verminderten Angebot an Organen sowie die oben  
20 beschriebenen Probleme erfordern eine Optimierung der bekannten Therapien. Durch die Einführung neuer verbesserter Immunsuppressiva konnte die 1-Jahrüberlebensrate auf 90% erhöht werden. Allerdings konnten die Langzeittransplantatüberlebensraten bisher nicht  
25 zufriedenstellend verbessert werden. Trotz moderner Immunsuppressiva kommt es immer noch bei der Mehrzahl der Patienten zur Entwicklung chronischer Transplantatdysfunktionen. Klinische und subklinische akute Reaktionen, auch wenn sie zunächst erfolgreich mit einer  
30 Rejektionstherapie behandelt werden, stellen dabei den größten unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung dieser späten Transplantatverluste dar. Eine effiziente Diagnostik und/oder Therapie derartiger - vor allem

5 subklinisch verlaufender - Prozesse ist daher von großer Wichtigkeit.

Eine Induktion einer Langzeit- und vornehmlich medikamentenfreien Transplantatakzeptanz ohne Beeinträchtigung der Organ-, Gewebe- oder Zellfunktionen und der  
10 Immunkapazität des Transplantatempfängers ist daher von großer Bedeutung. Klinisch wird die Toleranz als permanentes Transplantatüberleben mit normaler Organfunktion bei Abwesenheit akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen und dem Erhalt der antimikrobiellen  
15 Immunreaktivität definiert.

Neue Strategien zur Induktion einer Transplantattoleranz bestehen in der Applikation immunregulatorischer Proteine oder in einer Induktion eines Chimerismus. Bei den  
20 immunregulatorischen Proteinen kann es sich entweder um Antikörper handeln, die eine Depletion der donor-reaktiven T-Zellen bewirken, z.B. anti-CD3-Immunotoxin, oder um Antikörper und Proteine, die die Aktivierung der donor-reaktiven T-Zellen beeinflussen, z.B. anti-CD4-Antikörper, anti-CD40L-Antikörper oder CTLA4-Ig. Chimerismus bedeutet  
25 das parallele Vorhandensein von Blutleukozyten des Spenders und des Empfängers mit Hilfe nicht-myeloablativer Verfahren zur Transplantation von Stammzellen des Spenders.

Bisher erfolgte nach der Transplantation eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates dadurch, dass  
30 die Funktion des Transplantates als Maß herangezogen wird; z.B. durch die Bestimmung des Serumkreatininspiegels im Falle eines Nierentransplantates. Außerdem werden Biopate entnommen und nach dem „Banff Score“ histologisch

5 beurteilt. Damit kann beurteilt werden, ob Veränderungen  
assoziiert mit einer akuten Abstoßung - Infiltration  
mononukleärer Zellen - oder chronische Abstoßungen  
(Vaskulopathie) nachweisbar sind.

10 Klinisch manifeste Rejektionen werden durch Funktions-  
verschlechterung der Organe definiert, wie beispielsweise  
Herzfunktion, dem Serumkreatinin in dem der Lungenfunktion  
oder anderen. Leider stehen diese Funktions-  
verschlechterungen am Ende einer Effektkette. Eine  
frühzeitige Diagnostik bereits subklinisch ablaufender  
15 Prozesse wäre sehr hilfreich. Auch ist eine  
Funktionsverschlechterung nicht immer durch eine Rejektion  
bedingt; es gibt auch andere Ursachen wie Toxizität und  
Infektionen, die differentialdiagnostisch abgegrenzt werden  
müssen, was gegenwärtig viel Zeit beansprucht und oft sehr  
20 schwierig ist. Subklinisch verlaufende Reaktionen können  
bisher nur durch Protokollbiopsien und konventionelle  
Histologie, zumindest innerhalb gewisser Grenzen,  
verlässlich beurteilt werden. Jedoch werden dabei auch  
Infiltrate als negativ beurteilt, die möglicherweise eine  
protektive Wirkung auf das Transplantat haben, wie in  
25 Tierexperimenten gezeigt werden konnte. Für Nieren-  
transplantate wurde nachgewiesen, dass molekularbiologische  
Untersuchungen im Urin eine klinisch manifeste Rejektion  
reflektieren können, aber es fehlen Untersuchungen zum  
subklinischen Bereich der Rejektionen. Es besteht also ein  
30 großer Bedarf an Markern für das Monitoring von  
Transplantaten (Biopsate, Urin, Lavage, Blut etc), um  
unerwünschte Immunreaktionen gegen das Transplantat

5 rechtzeitig - d.h. möglichst vor der Organschädigung - und differentialdiagnostisch sicher - als Abgrenzung gegen andere Prozesse, die die Organfunktion beeinträchtigen - zu erfassen.

10 Aufgrund der Nebenwirkungen der chronischen Applikation der derzeit üblichen Mehrfachimmunsuppressivaschemata wird immer wieder versucht, bei gut gehender Funktion einzelne oder mehrere der immunsuppressiven Komponenten abzusetzen -  
nachteilhafterweise ist dieser Ansatz immer durch das Auftreten von akzelerierten Abstoßungsprozessen, manchmal  
15 erst Jahre nach Absetzen, gefährdet. Es fehlt völlig an Parametern, die ein derartiges Vorgehen verlässlich individuell optimieren könnten. Eine Verbesserung der bisherigen Strategien durch Einführung toleranzinduzierter Protokolle würde die Therapie durch weniger Nebenwirkungen  
20 und weniger Kosten revolutionieren. Die Übertragung der oben erwähnten toleranzinduzierenden Therapien auf den Menschen birgt jedoch etliche Gefahren, da nach Absetzen der Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager identifiziert werden müssen, um eine irreversible Schädigung des Transplantates durch Rejektion zu  
25 verhindern. Selbst in Tiermodellen werden niemals 100% der Empfänger tolerant.

Nachteilhaft bei den bisherigen Methoden ist es, dass keine Entscheidungen über das sichere Absetzen einer  
30 immunsuppressiven Therapie getroffen werden können, ohne dabei das Auftreten von Rejektionskrisen zu riskieren.

Ein weiterer Nachteil ist, dass die bekannten Methoden es nicht ermöglichen, während oder nach der Behandlung, auch

5 nach konventionellen Therapien, bevor eine Transplantats-  
funktionsverschlechterung auftritt, eine Vorhersage von  
Rejektionskrisen zu ermöglichen. Die bisher zur Verfügung  
stehenden diagnostischen Mittel und Methoden sind nur  
begrenzt zur Beurteilung einer toleranzinduzierenden  
10 Therapie einsetzbar. Die Beurteilung der Therapie  
hinsichtlich der Funktion des Transplantates - z.B. des  
Serumkreatinins - kommt zu spät, da es bei einem  
nachweisbaren Anstieg des Serumkreatinins schon zu einer  
Schädigung des transplantierten Organs, beispielsweise der  
15 Niere, gekommen ist. Hinsichtlich der toleranzinduzierenden  
Therapien bedeutet ein signifikanter Anstieg des  
Serumkreatinins ein Fehlschlagen der Therapie und für den  
Patienten wahrscheinlich das Umsteigen auf konventionelle  
Immunsuppressiva mit den bekannten Nebenwirkungen. Auch die  
20 bekannte Analyse einer Biopsie ist in diesem Fall nur  
bedingt hilfreich, da viele toleranzinduzierenden  
Therapien, wie z.B. mit anti-CD4-Antikörpern nur bedingt  
die Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat  
verhindern. Innerhalb der bisherigen Methoden und Verfahren  
würde dies als akute Abstoßungs-, bzw. Rejektionskrise  
betrachtet werden, und der Patient würde mit hochdosierten  
konventionellen Immunsuppressiva behandelt werden. Eine  
hochdosierte Gabe konventioneller Immunsuppressiva kann  
sich jedoch zusätzlich negativ auf den Erfolg der toleranz-  
30 induzierten Therapie auswirken, was ebenfalls ein  
Fehlschlagen der Therapie bedeuten würde. Aber auch für die  
konventionellen Immunsuppressionen wären verbesserte  
diagnostische Mittel und Methoden hinsichtlich der  
Früherkennung klinischer und subklinischer akuter



5 Abstoßungskrisen und beginnender chronischer Rejektions-  
prozesse hilfreich. Dies würde es unter anderem  
ermöglichen, die Therapie zu variieren bevor eine  
nachweisbare Schädigung des Transplantates - z.B. Anstieg  
des Serumkreatinins - vorliegt. Außerdem kann eine  
10 Verschlechterung der Organfunktion auch durch Nebenwirkung  
einer hochdosierten immunsuppressiven Therapie oder durch  
Infektionen im Transplantat hervorgerufen werden, was durch  
bekannte Methoden ebenfalls nicht detektiert werden kann.

15 Aufgabe der Erfindung ist es daher, effiziente und zu-  
verlässige Immunmarker bereitzustellen, welche eine sichere  
und schnelle Vorhersagbarkeit des Risikos einer  
Transplantatabstoßung bzw. des Fehlen selbiger - als Form  
einer Toleranz - in medizinischer Prophylaxe, klinischer  
Verlaufskontrolle oder der Transplantatnachbehandlung  
20 ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem  
durch die Bereitstellung eines isolierten Nucleinsäure-  
moleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 25 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 -  
8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen  
hybridisiert,
- 30 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine  
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie

5 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

10 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

15 Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle mit Entzündungen, insbesondere chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Läsionen, allgemeinen Wunden und Transplantat-Reaktionen, insbesondere mit Transplantatrejektionen oder anderen  
20 Transplantatdysfunktionen sowie dem Ausbleiben dieser - als Form der Transplantattoleranz - assoziiert sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül, das eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz ausgewählt aus der  
25 Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, zumindest zu 40% homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nucleotidsequenzen bzw. den mit diesen Nucleotidsequenzen hybridisierenden Sequenzen funktions-  
30 analog zu sein, dass die Homologen bei Transplantat-Reaktionen ein Verhalten zeigen, das Rückschlüsse auf das

5 Transplantat und dessen Verhältnis zum Empfängerorganismus zulässt.

Funktionsanaloge Sequenzen sind im Sinne der Erfindung all jene Sequenzen, die der Fachmann als gleichwirkend identifizieren kann. Beispielsweise ist es möglich, dass  
10 der Fachmann in verschiedenen Versuchstieren, wie z.B. der Ratte oder dem Kaninchen, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle identifiziert und so aufgrund von Homologie-Untersuchungen in der Lage ist, funktionsanaloge Strukturen in anderen Organismen, wie beispielsweise Schimpansen oder  
15 Hunden, zu identifizieren. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass der Fachmann aufgrund seiner Kenntnis der in der Maus oder Ratte gefundenen Nucleinsäuremoleküle auch in humanen Patienten Analoge und Homologe aufgrund von Homologie- oder Analogie-Untersuchungen detektiert.  
20 Weiterhin ist es möglich, dass der Fachmann im humanen Bereich isolierte erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle in spezifischen Versuchstieren detektiert, mit denen bestimmte Transplantationsreaktionen untersucht werden können, wie beispielsweise in Schweinen oder auch in wirbellosen Organismen, wie z.B. Nematoden bzw. anderen Organismen, die  
25 für spezifische Fragestellungen der Transplantationsbiologie herangezogen werden können.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nucleinsäuremolekül mindestens 60%,  
30 vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% Homologie zu einem Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen

5 auf, wobei dieses Nucleinsäuremolekül eine biologische Aktivität wie die unter SEQ ID Nr. 1-8 aufgezeigten Sequenzen oder deren komplementären Sequenzen aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül eine genomische DNA, eine cDNA  
10 und/oder eine RNA. Besonders bevorzugt ist das Nucleinsäuremolekül eine mRNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor  
15 (im erfindungsgemäßen Vektor) umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, was durch ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kodiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle  
20 und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nucleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so  
25 wechselwirken, dass eine Detektion dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nucleinsäuren sein, die mit den genannten Nucleinsäuremolekülen binden, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide,  
30 Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nucleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper.

5 Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die Erkennungsmoleküle ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-  
10 Interferenzmolekül.

Die Autoantikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (z.B. oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der  
15 vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle, als auch Autoantikörper-Fragmente, wie Fab, F(ab')<sub>2</sub> und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven  
20 Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

(1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten  
25 werden;

(2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine  
30 intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette

5 erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;

10 (3)  $F(ab')_2$ , das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt;  $F(ab')_2$  ist eine Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

15 (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

20 (5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

25 Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf dem Polypeptid. Epitop-Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächen-Gruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

30

Die Erfindung betrifft auch Vakzine, die das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das

5 Polypeptid und/oder das Erkennungsmolekül gegebenenfalls  
mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Bei  
dem pharmazeutisch akzeptablen Träger handelt es sich um an  
sich bekannte pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.  
Bei diesen, dem Fachmann an sich bekannten Zusatz- und  
10 Trägerstoffen, kann es sich auch um Liposomen bzw. um in  
der Gentechnik bekannte Strukturen bzw. Lösungen und/oder  
Puffergemische oder um andere Substanzen aus dem Bereich  
der Galenik handeln.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion von  
15 Transplantat-Reaktionen in einer Probe von einem Patienten,  
wobei in der Probe ein Level von mindestens einem  
Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 20 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 -  
8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen  
hybridisiert,
- 25 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotid-  
sequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um  
zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b)  
funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches  
Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert  
30 ist und ,

5 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

10 bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen wird, wobei durch einen modifizierten Level in der Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die Transplantat-Reaktionen - was auch das Fehlen selbiger als Toleranz einschließt -  
15 detektiert wird.

Als Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung wird demgemäß jede physiologische und pathophysiologische Wechselwirkung des Transplantates mit dem Empfängerorganismus aber auch jede isolierte Reaktion innerhalb des  
20 Transplantates verstanden. Die Transplantat-Reaktion kann daher im Sinne der Erfindung eine Toleranz sein bzw. eine Abstoßung des Transplantates. Demgemäß ist eine Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung auch ein nicht pathologischer, d.h. ein normaler oder gesunder, Zustand,  
25 in dem sich das Transplantat selbst und in Bezug auf den Empfängerorganismus befinden kann. Eine Probe im Sinne der Erfindung ist die Bezeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches Gut oder eines Teiles bzw. einer kleinen Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit  
30 chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll. Die Probenentnahme aus dem Patienten bzw. aus gewonnenen humoralen oder zellulären Bestandteilen des Patienten erfolgt insbesondere so, dass die entnommene



5 Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht.  
Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale  
dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge,  
die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, z.B. ein gesamtes  
10 transplantiertes Organ, wie Leber, Milz, Blut oder aber auch  
von nicht transplantierten Bestandteilen, wie z.B. dem  
Immunsystem, zulässt. Für die Untersuchung können die  
Proben durch Mischen, Zerteilen, Zerkleinern, Zugabe von  
Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem  
15 Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung  
der Proben bekannt. Selbstverständlich kann es auch  
vorgesehen sein, dass die Probe so entnommen wird, dass sie  
keinem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Eine  
Probe können alle biologischen und nichtbiologischen  
Materialien sein, wie biologische Gewebe und Flüssigkeiten,  
20 wie beispielsweise Blut, Lymphe, Urin, Gehirnflüssigkeit  
und andere.

Ein Transplantat im Sinne der Erfindung ist ein transplan-  
tiertes oder zu transplantierendes Organ, Gewebe oder eine  
Zelle bzw. eine Zellansammlung. Im Sinne der Erfindung  
25 können Transplantate jedoch auch bestimmte Implantate sein,  
die aus Stoffen bzw. Teilen bestehen, die zur Erfüllung  
bestimmter Ersatzfunktionen für einen begrenzten Zeitraum  
oder auf Lebenszeit in einen Körper eingebracht werden. Die  
Implantate können beispielsweise aus anorganischer Materie  
30 bestehen, die mit organischen Substanzen, wie  
beispielsweise Knorpel oder Knochenzellen, beschichtet ist.

Unter einer Transplantatabstoßung gemäß der Erfindung ist  
die Induktion einer Immunreaktion des Empfängers auf das

5 Transplantat zu verstehen, wobei eine Immunreaktion des  
Empfängers eine spezifische Schutz- oder Abwehrreaktion des  
Körpers gegen die Antigene bzw. andere Strukturen des  
Transplantates ist.

10 Ein Patient im Sinne der Erfindung ist jeder Organismus,  
der ein Transplantat umfasst, insbesondere ein humaner  
Organismus. Ein gesunder Patient im Sinne der Erfindung ist  
ein Patient, dessen Zustand es erlaubt, als Referenz für  
das vorliegende Verfahren verwendet zu werden. Gesund im  
15 Sinne der Erfindung muss nicht die völlige Abwesenheit von  
Krankheiten, Transplantaten oder pathogenen Veränderungen  
bedeuten. Der gesunde Patient stellt entweder einen  
einzelnen Patienten oder eine Durchschnittsmenge von  
Patienten dar, die als Vergleichsgruppe dergestalt dienen  
können, dass eine Veränderung des Levels der genannten  
20 Nucleinsäuremoleküle oder der Strukturen, für die sie  
kodieren bzw. den Erkennungssubstanzen bestimmt werden  
kann. Eine Modifikation des Levels im Vergleich zum  
Kontrolllevel heißt, dass die genannten Nucleinsäure-  
moleküle bzw. die oben genannten Immunmarker, wie  
25 insbesondere die Peptide oder die Erkennungssubstanzen, in  
ihrer Konzentration oder Aktivität als Protein, als  
Nucleinsäuremolekül oder als Antikörper detektierbare  
Veränderungen gegenüber dem Kontroll-Level aufweisen.

30 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das  
Transplantat ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lunge,  
Milz, Herz, Leber, Pankreas und/oder von Geweben,  
insbesondere Inseln, Aorten, Knorpeln. Selbstverständlich  
ist es möglich, dass die jeweils aufgezeigten Organe bzw.

5 Gewebestrukturen allein oder in Kombination transplantiert werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure, eine  
10 Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder als eine Konzentration von Isoformen bestimmt. Mit Vorteil kann der Fachmann verschiedene Möglichkeiten wählen, um den Level von mindestens einem Nucleinsäuremolekül zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die Bestimmung der  
15 Peptidkonzentration, die durch das Nucleinsäuremolekül kodiert werden, mit spektrografischen Methoden. Es ist jedoch auch möglich, den Level auf der RNA- bzw. DNA-, insbesondere mRNA- und/oder cDNA-Ebene zu bestimmen oder beispielsweise über die Aktivität der durch sie kodierten  
20 Proteine und/oder Peptide bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich möglich, dass der Level nur in dem Transplantat oder in Teilstücken desselben innerhalb oder außerhalb des Körpers bestimmt wird bzw. dass er in dem umgebenden Gewebe bzw. Körperflüssigkeiten bzw. in Biopsiematerialien oder in Flüssigkeiten, wie  
25 beispielsweise Urin, Lymphe oder Blut, detektiert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
30 ist die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf, der durch das erfindungsgemäße Verfahren detektiert wird. Der

5 Abstoßungsverlauf und die Abstoßungsreaktion können  
beispielsweise klinisch bzw. subklinisch verlaufen. Eine  
Toleranz im Sinne der Erfindung ist beispielsweise eine  
lang anhaltende normale Funktion des transplantierten  
Organs ohne Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über  
10 mehr als 100, bevorzugt 200, ganz besonders bevorzugt 300  
Tage.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
wird durch einen verminderten Level eines  
Nucleinsäuremoleküls umfassend eine Nucleotidsequenz  
15 ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3  
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären  
Nucleotidsequenzen,
- 20 b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen  
hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine  
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie  
25 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b)  
funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches  
Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c)  
degeneriert ist und
- 30 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz  
nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen,

5            Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder  
Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

10           die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die  
Rejektionskrise detektiert. Ein Abstoßungsverlauf kann  
beispielsweise der Verlauf einer Abstoßungsreaktion mit  
bzw. ohne Medikamentengabe sein, wobei diese Medikamente  
beispielsweise immunsuppressierende Substanzen sein können.  
Mit Vorteil kann durch den verminderten Level der  
Nucleotidsequenzen            bzw.            deren            komplementären  
15           Nucleotidsequenzen bzw. Nucleinsäuremolekülen, welche mit  
diesen Nucleotidsequenzen unter stringenten Bedingungen  
hybridisieren oder Nucleotidsäuremoleküle, die eine  
ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten  
Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, bestimmt  
20           werden, ob das Transplantat selbst oder in Bezug auf den  
Empfängerorganismus            zu            unphysiologischen            bzw.  
pathologischen Prozessen neigt.

25           In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls  
umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe  
umfassend

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1  
und SEQ ID Nr. 2 oder deren komplementären  
30           Nucleotidsequenzen,

5        b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

10       c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

15       d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

20       e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

25       die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise detektiert. Im Sinne der Erfindung gehören zu den genannten Nucleinsäuremolekülen insbesondere die Nucleinsäuremoleküle, die unter stringenten Bedingungen mit den genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren als auch solche Nucleinsäuremolekülen, die eine ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten Nucleinsäuremolekülen funktionsanalog zu sein sowie solche, die infolge des genetischen Codes degeneriert sind bzw. durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu der genannten Nucleotidsequenz der Nucleinsäuremoleküle sind.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- 10 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- 15 b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- 20 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 25 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

30 die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert. Mit Vorteil ist es also möglich, durch die Detektion eines erhöhten Levels der genannten Nucleinsäuremoleküle zu bestimmen, ob das transplantierte Organ, das

5 transplantierte Gewebe bzw. die einzelne Zelle von dem Empfängerorganismus in einer Art und Weise akzeptiert wird, dass pathologische Reaktionen weitestgehend ausbleiben.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Nucleinsäuremoleküls, des Vektors, der Wirtszelle, des  
10 Polypeptids, des Erkennungsmoleküls und/oder der Vakzine in der medizinischen Prophylaxe, der klinischen Verlaufskontrolle, der Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie. Der Fachmann kann die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle bzw.  
15 Vektoren, Wirtszellen, Polypeptide, Erkennungsmoleküle und/oder Vakzine im Bereich der Prophylaxe, Verlaufskontrolle, Diagnostik oder Therapie einsetzen. Beispielsweise ist es möglich, die biologischen Strukturen, die bei einer Abstoßungsreaktion bzw. einer Reaktionskrise  
20 in ihrem Level erhöht sind, in Form einer Therapie zu erniedrigen, um somit eine Toleranz bzw. Bedingungen für eine nachfolgende Toleranz des Transplantates zu ermöglichen, zu indizieren bzw. zu unterstützen. Dies kann beispielsweise durch die Gabe von Antisense-Konstrukten bzw. RNA-Molekülen erfolgen, die in der Lage sind, eine RNA-Interferenz zu erzeugen. Es ist jedoch auch möglich, die durch die Nucleinsäuremoleküle kodierten Peptide bzw. Proteine, deren Level auch erhöht sein kann, durch Antikörper funktional so zu beeinträchtigen, dass ein  
30 physiologischer Zustand im Transplantat bzw. zwischen Transplantat und Empfängerorganismus indiziert, erreicht oder unterstützt werden kann. Selbstverständlich ist es auch möglich, einen verminderten Level von



5 Nucleinsäuremolekülen in Form einer therapeutischen  
Maßnahme zu erhöhen, wenn ein verminderter Level mit einer  
Abstoßungsreaktion bzw. einer Rejektionskrise assoziiert  
ist. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt,  
den Level der genannten Substanzen oder Moleküle zu  
10 modifizieren, im vorliegenden Fall insbesondere zu erhöhen.  
Eine Erhöhung eines Proteinlevels ist beispielsweise  
dadurch möglich, dass der Nucleinsäure, die das  
entsprechende Protein kodiert, die natürlich im Organismus  
oder Transplantat vorliegen kann bzw. in das  
15 transplantierte Organ eingebracht wird, ein zusätzlicher  
Promoter vorgeschaltet bzw. der ursprüngliche Promoter in  
seiner Aktivität verstärkt wird. Weiterhin ist es möglich,  
die Kopienanzahl der Nucleinsäuren im entsprechenden  
Zielgewebe zu erhöhen, wodurch mehr Nucleinsäuremoleküle  
20 bereitgestellt werden und mehr Proteine exprimiert werden  
können. Dem Fachmann ist bekannt, dass derartige Maßnahmen  
nicht nur innerhalb der Therapie sondern auch in einem  
Protokoll zur Prophylaxe bzw. das zur Transplantat-  
nachbehandlung durchgeführt werden können. Klinische  
Verlaufskontrollen bzw. diagnostische Maßnahmen können mit  
Vorteil so erfolgen, dass im Verlauf von bestimmten, durch  
den Fachmann festzulegenden Zeitabständen im Urin bzw.  
Biopsiematerial eine Quantifizierung der Expression der  
Nucleinsäuremoleküle bzw. der sie kodierenden Peptide oder  
30 Fragmente erfolgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
werden die Nucleinsäuremoleküle und ihre Homologe bzw. die  
modifizierten Nucleinsäuremoleküle zur Detektion von T-

5 Zell-vermittelten Immunprozessen, insbesondere von  
pathogenen T-Zell-vermittelten Immunprozessen verwendet.  
Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und auch ihre  
Abkömmlinge, ihre komplementären Strukturen sowie die  
Peptide, die sie kodieren, können beispielsweise genutzt  
10 werden, um Komplementreaktionen bzw. andere Prozesse zu  
detektieren, bei denen T-Zellen eine gewisse Bedeutung  
haben. Insbesondere können pathogene T-zell-vermittelte  
Immunprozesse wie z.B. Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide  
Arthritis, chronische Darmentzündung, Dermatosen und/oder  
15 Allergien detektiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der  
Erfindung werden als T-Zell-vermittelte Immunprozesse  
Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen detektiert,  
insbesondere eine antiglomeruläre Basalmembrankrankheit,  
20 Autoimmunkrankheiten des Nervensystems, ein systemischer  
Lupus erythematodes, eine Addison-Krankheit, ein  
Antiphospholipid-Syndrom, eine IgA-Glomerulonephritis, ein  
Goodpasture-Syndrom, ein Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom,  
ein bullöses Pemphigoid, eine thrombozytopenische,  
idiopathische Purpura, eine Autoimmun-Thyreoiditis, eine  
rheumatoide Arthritis, ein insulinabhängiger Diabetes  
mellitus, ein Pemphigus, eine autoimmunhämolytische Anämie,  
ein Dermatitis herpetiformis Duhring, eine membranöse  
Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine  
30 sympathische Ophthalmie, Autoimmun-Polyendokrinopathien,  
multiple Sklerose und/oder Reiter-Krankheit.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische, pathologische und/oder klinische Transplantat-Reaktionen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine  
10 Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das Polypeptid, das Erkennungsmolekül und/oder die Vakzine  
15 umfasst.

Die Erfindung weist mehrere Vorteile auf. So ist es insbesondere möglich, nach Transplantationen eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates durchzuführen; wobei es möglich ist, die als Marker  
20 verwendeten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Peptide bzw. Erkennungssubstanzen aus verschiedenen Proben des Patienten, beispielsweise Urin, zu gewinnen. Somit ist es insbesondere möglich, frühzeitig Funktionsverschlechterungen des Transplantates, sozusagen am Beginn der Effektorkette, festzustellen. Durch die erfindungsgemäßen Substanzen und das erfindungsgemäße Verfahren ist es also  
25 möglich, bereits subklinisch ablaufende Prozesse frühzeitig zu diagnostizieren. Somit müssen subklinisch verlaufende Reaktionen nicht mehr mit Kontrollbiopsien und konventioneller Histologie bestimmt werden. Weiterhin  
30 können die genannten Substanzen als Marker für das Monitoring von Transplantaten benutzt werden, um unerwünschte Immunreaktionen vor der Organschädigung und

5 differentialdiagnostisch sicher zu erfassen. Das Monitoring  
kann beispielsweise als Verlaufskontrolle bei Mehrfach-  
immunsuppressivaschemata verwandt werden, wobei gutgehende  
Funktionen einzelne oder mehrere der immunsuppressiven  
Komponenten abgesetzt werden können, wobei das Auftreten  
10 von akzelerierten Abstoßungsprozessen frühzeitig erkannt  
werden kann. Das Verfahren lässt sich dadurch auch  
individuell von Patient zu Patient optimieren. Auch ist es  
durch die Marker mit Vorteil möglich, toleranzinduzierte  
Protokolle und toleranzinduzierende Therapien auf den  
15 Menschen zu übertragen, da nach Absetzen der  
Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager  
identifiziert werden können, um eine irreversible  
Schädigung des Transplantates zu verhindern. Das heißt, die  
erfindungsgemäßen Substanzen, das erfindungsgemäße  
20 Verfahren und die Verwendungen stellen exakte  
Analysemethoden zur Verfügung, um die Induktion, den Erfolg  
und die Erhaltung einer Toleranz zu beurteilen. Mit dem  
erfindungsgemäßen Verfahren kann unter anderem auch das  
Zusammenbrechen der Toleranz, beispielsweise durch  
Vorliegen einer Infektion, vorhergesagt werden. Es ist  
daher möglich, Entscheidungen über das sichere Absetzen  
einer immunsuppressiven Therapie zu treffen, ohne dass  
vorteilhafterweise das Auftreten von Reaktionskrisen  
riskiert werden muss. Eine wichtige Anwendung der  
30 erfindungsgemäßen Nucleinsäure des erfindungsgemäßen  
Verfahrens ist daher die Vorhersage von Reaktionskrisen  
während oder nach der Behandlung, auch nach konventionellen  
Therapien, bevor eine Transplantatfunktionsverschlechterung  
auftritt. Weiterhin wird aber auch die konventionelle

5 Immunsuppression durch die erfindungsgemäßen  
Nucleinsäuremoleküle und das erfindungsgemäße Verfahren  
hinsichtlich der Früherkennung klinischer und subklinischer  
akuter Abstoßungskrisen und beginnender chronischer  
Reaktionsprozesse verbessert. Es ist durch die Erfindung  
10 möglich, die Therapie zu variieren, bevor eine nachweisbare  
Schädigung des Transplantates vorliegt. Weiterhin ist es  
möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und die  
durch sie kodierten Proteine bzw. Proteinfragmente zum  
Screening von Arzneimitteln zu verwenden, die bei der  
15 Diagnose und Therapie von Transplantat-Reaktionen  
eingesetzt werden können.

Die Erfindung soll im Folgenden anhand von  
Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie  
darauf einzuschränken.

20

### Beispiel

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können in  
Labortieren identifiziert werden, so beispielsweise in dem  
anerkannten orthotropen Nierentransplantationsmodell: der  
Ratte, bei dem die Expression der erfindungsgemäßen Marker  
zur postoperativen Diagnostik verwendet werden kann. In dem  
verwendeten Transplantationsmodell (WF Spendernieren nach  
BDIX Rezipienten) kann durch mehrmalige Applikation eines  
anti-CD4-Antikörpers RIB5/2 eine Toleranz gegenüber  
25 Nierentransplantaten induziert werden, die im  
Kontrollantikörper behandelten Empfängertiere zwischen Tag  
5 und 9 abgestoßen werden. Die Toleranz zeichnet sich durch  
eine lang anhaltende normale Nierenfunktion ohne  
30

5 Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über mehr als 300 Tage aus. Die Infiltration donor-reaktiver T-Zellen ist nur zu 50% herabgesetzt, jedoch kommt es nicht zur Zerstörung des transplantierten Organs.

10 Im Rahmen der Erfindung wurden von mit Kontrollantikörpern bzw. RIB/2 behandelten Empfängertieren die in das Transplantat eingewanderten mononukleären Zellen am Tag 5 nach der Transplantation durch Kollagenaseverdau und Ficollgradient isoliert und deren mRNA Expression mit Hilfe der „PCR-Select“ Methode verglichen. Dies führte zur  
15 Isolierung von cDNA Fragmenten, die verstärkt in Transplantaten rejizierender Empfängertiere exprimiert werden: 2A5 und 2A15 (entspricht SEQ ID Nr. 1 und 2). Ebenso konnten cDNA Fragmente isoliert werden, deren Expression in Transplantaten toleranzentwickelnder  
20 Empfängertiere erhöht ist: 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10 (entspricht SEQ ID Nr. 3, 4, 5, 6, 7 und 8). In Abb. 1 sind die cDNA Sequenzabschnitte der erwähnten Fragmente dargestellt.

25 Von den hier dargestellten Sequenzabschnitten wurden weiterhin erfindungsgemäß Oligonukleotidsequenzen für die Durchführung einer Real Time RT-PCR abgeleitet. Mit Hilfe dieser Oligonukleotidsequenzen ist eine relative Quantifizierung der Expression der korrespondierenden mRNA's in Bezug zum „house keeping gene“  $\beta$ -actin in  
30 Rattenzellen möglich. Ebenso wurden anhand der homologen Maussequenzen Oligonukleotidsequenzen zur relativen Quantifizierung der korrespondierenden mRNA's in Bezug zum „house keeping gene HPRT“ in Mauszellen etabliert.

5 Mit Hilfe der so etablierten Oligonukleotidsequenzen wurden  
im Rahmen der Erfindung kinetische Expressionsstudien in  
mehreren Transplantationsmodellen durchgeführt. Neben dem  
bereits erwähnten Nierentransplantationsmodell in der Ratte  
wurde die Expression der Fragmente auch in einem  
10 Herztransplantationsmodell in der Maus analysiert. In  
diesem Modell wird den Empfängertieren (CBA) 4 Wochen vor  
der Transplantation eine donor-spezifisch Bluttransfusion  
(B10) in Kombination mit dem anti-CD4 Antikörper YTS177  
verabreicht. Das führt zur Induktion einer donor-  
spezifischen Toleranz zum Zeitpunkt der Transplantation.  
15 Kontrollherzen in unbehandelten Empfängertieren werden  
zwischen Tag 7 und Tag 8 abgestoßen.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse für  
die Fragmente 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10 im  
20 Nierentransplantationsmodell dargestellt. Abgebildet ist  
die mRNA Expression der Fragmente im Transplantat für  
Kontroll-Antikörper behandelte Empfängertiere (Co) am Tag 0  
(naive Nieren), 2 und 5 nach der Transplantation, außerdem  
ist die Expression für RIB5/2-behandelte  
25 toleranzentwickelnde Empfängertiere (RIB5/2) am Tag 0, 2,  
5, 10, 14 und 300 nach der Transplantation dargestellt.  
Alle cDNA Fragmente werden in permanent akzeptierten  
Transplantaten stark exprimiert, hingegen nimmt ihre  
Expression in Transplantaten Kontroll-Antikörper  
30 behandelter Empfängertiere zum Zeitpunkt der Rejektion  
drastisch ab.

Anschließend wurde die Expression der korrespondierenden  
mRNA's im Herztransplantationsmodell untersucht. In Abb. 3

5 ist die Expression der Fragmente 1A50 und T8 im  
transplantierten Organ dargestellt. Analysiert wurde die  
mRNA Expression in Transplantaten vorbehandelter  
toleranzentwickelnder Empfängertiere (DST+YTS177) am Tag 0  
(naive Herzen), 2, 5, 7, 8, 10, 40 und 100 nach  
10 Transplantation. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der  
mRNA Expression im Transplantat unbehandelter Kontrolltiere  
(Co) am Tag 0 (naive Herzen), 2, 5, 7 und 8. Auch im  
Herztransplantationsmodell weisen permanent akzeptierte  
Transplantate eine hohe mRNA Expression an 1A50 und T8 auf.  
15 In Transplantaten rejizierender Empfängertiere ist die  
Expression wiederum stark vermindert.

Die unterschiedliche Expression an 1A50 und T8  
widerspiegelt sich auch im peripheren Blut. Nur in  
Blutzellen von unbehandelten Empfängertieren (Co) kommt es  
20 kurz vor der Rejektion (Tag 5) zum Abfall der Expression  
von 1A50 und T8 (Abb. 4).

Weiterhin wurde die Expression der cDNA Fragmente 2A5 und  
2A15 im Nierentransplantationsmodell (Abb. 5) und im  
Herztransplantationsmodell (Abb. 6) untersucht. Dargestellt  
ist jeweils die Expression dieser cDNA Fragmente im  
25 Transplantat rejizierender Empfängertiere. In beiden  
Modellen kommt es zur Hochregulation der mRNA Expression  
kurz vor der Rejektion.

Mit Hilfe der Identifizierung und Quantifizierung von  
30 solchen Genmarkern, deren Expression im Transplantat, in  
Flüssigkeiten aus dem Transplantat (Urin, Lavage) oder  
peripherem Blut entweder mit einer lang anhaltenden guten  
Transplantatfunktion oder dem Auftreten von Rejektionen



5 korreliert, wäre eine Beurteilung der toleranzinduzierenden Therapie besser möglich.

Die Expression von 2A5 und 2A15 kann in der Biopsie zur Beurteilung von akuten subklinischen Rejektionskrisen und beginnender chronischer Rejektionen verwendet werden. Dabei  
10 wäre eine starke, lang anhaltende Expression mit einer Rejektion des Organs assoziiert. Dies ist nur bedingt abhängig vom Ausmaß der Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat, da in anti-CD4 behandelten toleranzentwickelnden Empfängertieren im Nierentransplan-  
15 tationsmodell die Infiltration der mononukleären Zellen nur zu 50% reduziert ist. Dies würde die Auswertung einer Biopsie erheblich verbessern, da nicht nur die Infiltration in das Organ als Kriterium für eine akute Abstoßung herangezogen wird, sondern auch qualitative Veränderungen  
20 der infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10, 3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie kann z.B. zur Beurteilung des Therapieerfolges herangezogen werden. Dies würde eine Entscheidung über die sichere Beendigung der toleranzinduzierenden Therapie ermöglichen.

25 Der starke Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der Peripherie in rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage vor klinischer Manifestation der Rejektion ermöglicht eine non-invasive Diagnostik im Blut des Patienten bevor eine Organverschlechterung (z.B. Anstieg des Serumkreatinins)  
30 nachweisbar ist.

Die Expression von 2A5 und 2A15 in der Biopsie kann zur Beurteilung von akuten klinischen und subklinischen Rejektionskrisen und beginnender chronischer Rejektionen

5 verwendet werden. Dabei ist eine starke lang anhaltende  
Expression mit einer immunologischen Rejektion des Organs  
assoziiert. Dies ist nur bedingt abhängig vom Ausmaß der  
Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat, da  
in anti-CD4 behandelten toleranzentwickelnden  
10 Empfängertieren im Nierentransplantationsmodell die  
Infiltration der mononukleären Zellen nur zu 50% reduziert  
ist. Dies verbessert die Auswertung einer Biopsie  
erheblich, da nicht nur die Infiltration in das Organ als  
Kriterium für eine akute Abstoßung herangezogen wird,  
15 sondern auch die qualitative Veränderung der  
infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10,  
3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie wird zur Beurteilung des  
Therapieerfolges herangezogen. Dies ermöglicht eine  
Entscheidung über die sichere Beendigung der  
20 toleranzinduzierenden Therapie. Der starke  
Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der Peripherie in  
rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage vor der  
Rejektion ermöglicht eine non-invasive Diagnostik im Blut  
oder anderen Körperflüssigkeiten, wie in dem Urin, der  
Patienten bevor eine Organverschlechterung, wie der Anstieg  
des Serumkreatinins, nachgewiesen werden kann. Somit ist  
folgendes Diagnostikmodell nach der Transplantation  
erfolgreich:

- 30 1. Nachweis von 1A50 und T8 im Blut oder anderen  
Körperflüssigkeiten (z.B. Urin) des Patienten täglich  
kurz nach der Operation und wöchentlich/monatlich im  
weiteren Verlauf, um eine Rejektionskrise und damit  
Fehlschlagen der Therapie vorherzusagen bzw. bei

5        Absetzversuchen eine Untersuppression zu detektieren,  
bevor eine Organverschlechterung nachweisbar ist.

2.    Nachweis von 2A5 und 2A15 in Kontrollbiopsien oder  
transplantatrelevanten Körperflüssigkeiten (z.B. Urin  
bei        Nierentransplantation),        um        ebenfalls  
10        Rejektionskrisen        bzw.        eine        Untersuppression  
rechtzeitig zu detektieren und die Gefahr der  
Entwicklung einer chronischen Abstoßung vorherzusagen.

3.    Nachweis von T4, T5, T8, T10, 1A50 und 3A29 in  
Kontrollbiopsien        oder        transplantatrelevanten  
15        Körperflüssigkeiten,        um        den        Erfolg        der  
toleranzinduzierenden oder konventionellen Therapie  
einzuschätzen, insbesondere, um das gefahrlose  
Absetzen/Reduzieren der Therapie zu ermöglichen.

5

**Patentansprüche**

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

10

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 - 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,

15

b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

20

c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

25

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

- 5        2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens 40%  
homolog zu einer der unter a) angegebenen  
Nucleotidsequenz ist.
- 10
3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens  
15        60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders  
bevorzugt 90% homolog zu einer der unter a) angegebenen  
Nucleotidsequenz ist.
- 20        4. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA  
ist.
- 25
5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem  
der Ansprüche 1 bis 4.
- 30        6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.

5        7. Polypeptid, kodiert durch ein Nucleinsäuremolekül gemäß  
einem der Ansprüche 1 bis 4.

10       8. Erkennungsmolekül            gerichtet            gegen            ein  
Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,  
einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß  
Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.

15       9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein  
Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-  
Interferenzmolekül.

20

25       10. Vakzine, umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem  
der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5,  
eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein  
Polypeptid gemäß Anspruch 7 und/oder ein  
Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 gegebenenfalls  
mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

30       11. Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen in  
einer Probe von einem Patienten,  
dadurch gekennzeichnet, dass

5 in der Probe ein Level von mindestens einem  
Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Anspruch 1 bis 4  
bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer  
Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen  
wird, wobei durch einen modifizierten Level in der  
10 Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die  
Transplantat-Reaktionen bzw. das Fehlen selbiger  
(Toleranz) detektiert wird.

15 12. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe  
bestehend aus Lunge, Milz, Herz, Niere, Leber, Pankreas  
allein oder in Kombination und/oder von Geweben,  
20 insbesondere Inseln, Aorten, Knorpel.

25 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als der Level eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine  
Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure,  
eine Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder  
eine Konzentration von Isoformen, bestimmt werden.

30

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt wird.

5

10

15

20

30

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine  
Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine  
Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf  
detektiert werden.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
durch einen verminderten Level eines  
Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3  
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären  
Nucleotidsequenzen die Abstoßungsreaktion, der  
Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise  
detektiert wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül  
umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der  
Gruppe bestehend aus SEQ ID 1 und Nr. SEQ 2 oder deren  
komplementären Nucleotidsequenzen die  
Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die  
Rejektionskrise detektiert wird.



5

10

15

20

25

30

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert wird.

19. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, eines Vektor gemäß Anspruch 5, einer Wirtszelle gemäß Anspruch 6, eines Polypeptid gemäß Anspruch 7, eines Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 und/oder einer Vakzine gemäß Anspruch 10 in der medizinischen Prophylaxe, klinischer Verlaufskontrolle, Transplantat-nachbehandlung, klinischer Diagnostik und/oder Therapie.

20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Detektion von T-Zell-vermittelten Immunprozessen, insbesondere pathogenen T-Zell-vermittelten Immunprozessen.

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20,

5 dadurch gekennzeichnet dass  
 die T-Zell-vermittelten Immunprozesse  
 Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen sind,  
 insbesondere eine antiglomeruläre  
 Basalmembrankrankheit, Autoimmunkrankheiten des  
 10 Nervensystems, ein systemischer Lupus erythematoses,  
 eine Addison-Krankheit, ein Antiphospholipid-Syndrom,  
 eine IgA-Glomerulonephritis, ein Goodpasture-Syndrom,  
 ein Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom, ein bullöses  
 Pemphigoid, eine thrombozytopenische, idiopathische  
 15 Purpura, eine Autoimmun-Thyreoiditis, eine rheumatoide  
 Arthritis, ein insulinabhängiger Diabetes mellitus, ein  
 Pemphigus, eine autoimmunhämolytische Anämie, ein  
 Dermatitis herpetiformis Duhring, eine membranöse  
 Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine  
 20 sympathische Ophthalmie,  
 Autoimmun-Polyendokrinopathien, multiple Sklerose  
 und/oder Reiter-Krankheit.

25

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21,  
 dadurch gekennzeichnet dass  
 die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische,  
 pathologische, klinische und/oder subklinische  
 Transplantat-Reaktionen sind.

30

23. Verwendung nach Anspruch 22,  
 dadurch gekennzeichnet, dass

5 die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

10 24. Kit umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 7, ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 und/oder eine Vakzine gemäß Anspruch 10.

5

### Zusammenfassung

10

15

Die Erfindung betrifft Immunmarker zur Detektion von Entzündungen, Immunreaktionen und insbesondere von Transplantattoleranzen bzw. Transplantat-Reaktionen, ein Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen oder -toleranzen sowie die Verwendung von Immunmarkern zur medizinischen Prophylaxe, klinischen Verlaufskontrolle, Transplantat-Nachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie im Zusammenhang mit Zell-, Gewebe- bzw. Organtransplantationen.

---

SEQ ID Nr. 1

(Seq ID: 2A5)

ACTTTCTCTA TAGCTCCTGG TAAGTAAATT TCTTTCTCCA ATACTTTTTG 50  
AGTTAAATGT TTTAGTTTAT GTGGGGGTTT AGTTATGTTG GTTGGTTGTA 100  
G 101

---

SEQ ID Nr. 2

(Seq ID: 2A15)

TTTTTAAAA AGCAGCCGGG GCCTGGGGTT TCTACCCGTG TACCAGGGGC 50  
CCTCTGGCCC AGAGCTGACC AAATCTGGCT CCATGGAGCA CACAGAGGCT 100  
TTGATCAGGG ACAGTAATCC TCTGCAACAT CAGGAATGGC TGAATGCACA 150  
GGATTACCA AGCCTCAGCC AAAGCATCCC GTGGCCTGAT GTCTCGGAGC 200  
AACCCTGTCC ACACGAGGAA AGGTCAGGCC TGCTCAACAT GACCAAGATT 250  
GCTCAAGGAG GGCGCAAAC CAGGAAGAGC CGGGGCCCTG CTTGGGTAG 299

---



---

SEQ ID Nr. 3

(Seq ID: 1A50)

GACTTTATTC ACAATAGAGA AATTTTACAA ATATAATTTT TAAAAATTAT 50  
GTGTCAATCT ATTATGTTTT CCGTAACATC AGAGATTTAT ATAAAGTTGG 100  
AAACAACAGA ATGCACTTAT GAACAAATCA AAAACAATGT TTAAATTGGA 150  
TGGATACACA CGACAGAGAA GTCCTGAGT TCTCTAAATG AGCACACAAC 200  
TTATAGGTGT ATATTAAGT CACAAAGTAT CCAAAACATG TTTGTAACAC 250  
AAAATCGGGT GCTACTTTAA CTGCTCACCT TTAAGGGCGT GGATCATACA 300  
TGTAAGTCAA ATTGCACAGC TTTGTTGGAA ATGAATGACT CGTCATCTAT 350  
TTGGAGACTT CCGTTGCTTA AAATTGACAC AAAAGCCTAA TCAATTACGC 400  
TACTATAAAA TTTGTCTCTT ATCTCGTTTA AATTTTGGT GTTCTGTGAT 450  
CTGGCATTAA AAAACAGTCC AAGTTTAAA ACAGAAAACA TTGCTCGCCA 500  
TTTGGAGAGT AGCTCGTGGT TCGGCTTCCT CCCTGCTCGA ACCGGAACAA 550  
CGCTACAGT 560

---

SEQ ID Nr. 4

(Seq ID: 3A29)

ACATTCATTA TTAAATGTGA TAATAGAGGT AGAGGTATAA ATAATATGAA 50  
GGGGTGAGGG AACCAGTTCT ACCCGGTTTG TTTTGAATGC TTAAATTATG 100  
TAATTTAAAT AGATAATCTT TACTTATGTA GGTCTTTTGG AAATAACTTT 150  
ATAAATTTAA CACAGAGGAC TACTACTAAA CGTGAGAGGT ATGATAATCG 200  
GCATGGAAGT TGGGCTGGTT GACCACCAA GTTCAATTCT TAAAGACATC 250  
TTAATCCTGA ATATAAAAAT GCCTTTGTGG GTTTAGAATT AGAATTTAAT 300  
TTTGGCATT 310

---

SEQ ID Nr. 5

(Seq ID: T4)

ACTGCATGAT GGGTTTATT GAGACCAGGG GACAGTGTGA CACTCAGGGG 50  
TTTTCCTTCA TAACTTCTTT TATCCAGGAG GTGAACTTAA TAAGTTTGGT 100  
GTAGATGGCT GGCATGTTGG TTTTGGCGCA TGATAG 136

---

---

SEQ ID Nr. 6

(Seq ID: T5)

CTATCATGCG TGTAGTCTTG GTGCCCTGGC CGAGTTAGAA GCCAGCTGAG 50  
ATAGCTTGCA GCATCTCTTC TAGTTTGAGT GATGATGTAA TGAGGAAAAT 100  
CTAGTAGGTA GAAAGAGTTC AGGAAGAAGG AAACCTCCT CTGCCTTTGA 150  
AAAGAGGCTC TGCAGGAGCA TCACGCCCTT CACAGAGAAG AGTGTAGACT 200  
GGCTTTCCAC TAGTGTTGAA CCTACACTCT TCGGTGGGTT AACAGTCATG 250  
TGCTCGCCAT CAGAGCCTTT TTGCATGCAG TGGTGGGCTC TCCCGGTTTA 300  
TCCACCTCC CACAGGTGAT TAAACCACAG CCCTGTAAAA AAAAAA 347

---

SEQ ID Nr. 7

(Seq ID: T8)

TTACCCACAG TGCATTATAA CAAAGGAGAT GCTAAAGTCA GTTTTTCATG 50  
TTTGTGGTTT TTCTGAAACA TCATTCATTT AAACAATTCA AATATATGTT 100  
CAAAATAAGA AGTGGTTTAT AAAAGGATTG TGTGTGCCAT GTGGCTTTTG 150  
ACCCGTGCTA TTATAAATGT TGCCATAAAT ACTCTCTATA AGAAACAGTC 200  
CTTAAGTAGA TTTGGTGGCA CACATCTTTA ATCCCAGCAC TTGGGAAGCA 250  
GAGACAGGTG GATCTCTGTG AGTTTAAGAC CAACCTGGTC TATAAAGTGA 300  
GTTCCAGGAC AGCCAGGGTT GTTAAACATA GAGAAACTCT GGGGCGATGG 350  
GGAGGGGTCT CGTCAAACAT GAAATTTATT AGAAAATTGG TCGGATTAAG 400  
CTATGTCTAG TATCAACTAA TATGGAATCT TGTATAATCT GTGTTACATT 450  
GGATTTGTCT CAGAACTAAT TGTTTCATAA TAAACTATGC CTTGGCCACC 500  
ACGAAAAAAA AAA 513

---

SEQ ID Nr. 8

(Seq ID: T10)

AGGCTAGGGC TAGTTCTGCG GACCCTCTCG GAGAGAGGAA TAAGGTTGAA 50  
CTGCCTGTCC GGTCTCCTT CCCCTATTCC CAGATGCAGG TGGAAGCCTC 100  
CCTCTAGTCC TTCCCCCTAA CCGCGACGAA GACCTTGGCT AACACTTGCT 150  
CCTTTCGCAC ACCATAGAAA ATGCAGTGCA GACAAACACA GCCTCGTCAG 200  
GCGCTTGAGG AGCGAAGTCC AATCTGGGTC GGCACCTGCA CCAGGTCTTT 250  
GCGCACCTGG TCAGAAGACC GGCACCCAAT AGTTGCTTAT TAAACTCTAC 300  
GTTTGTCCCG AAA 313

---



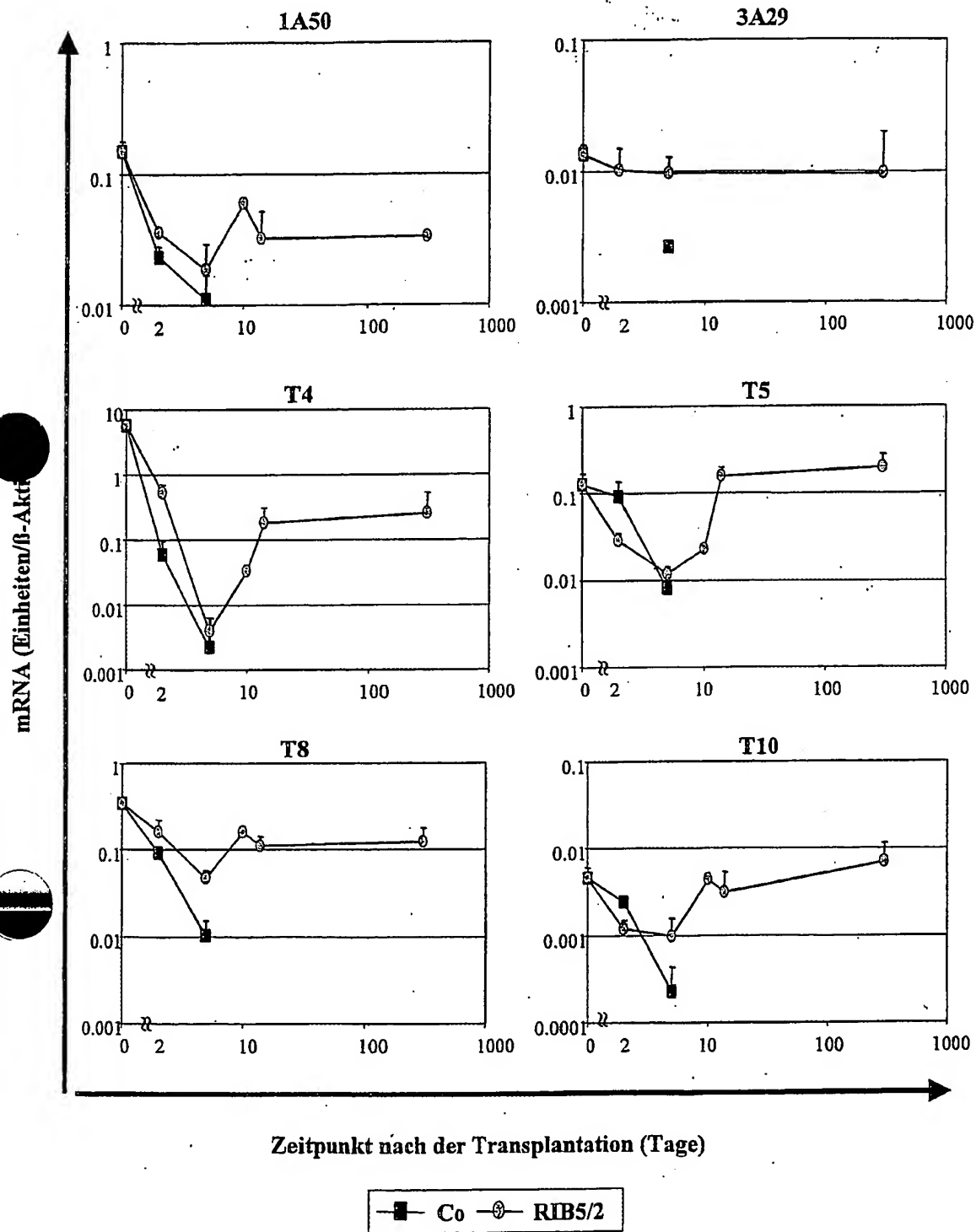


Abb. 2

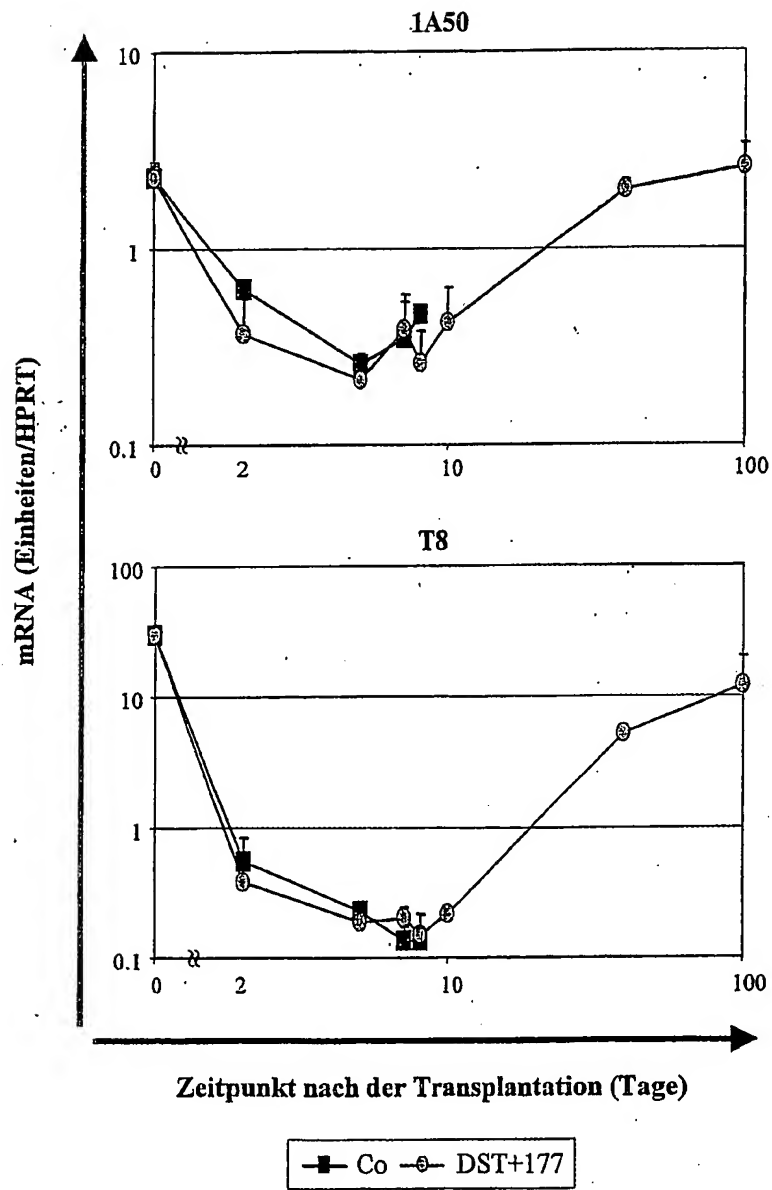


Abb. 3

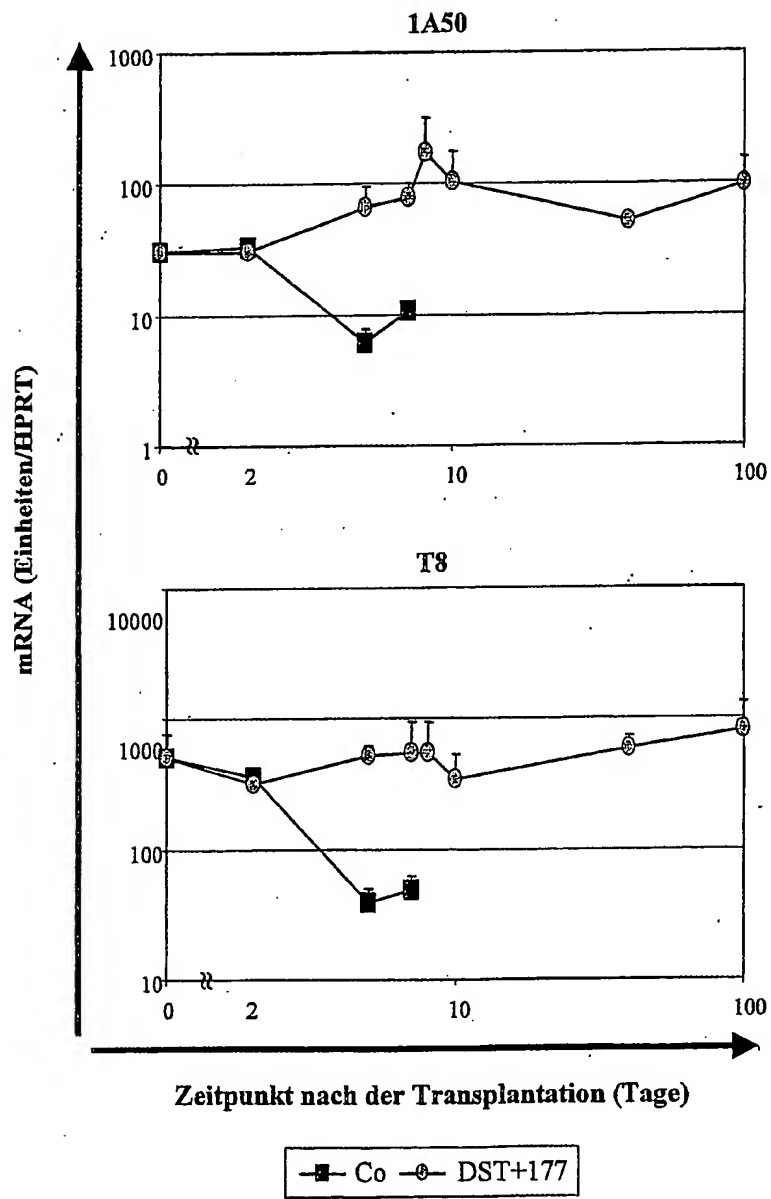


Abb. 4

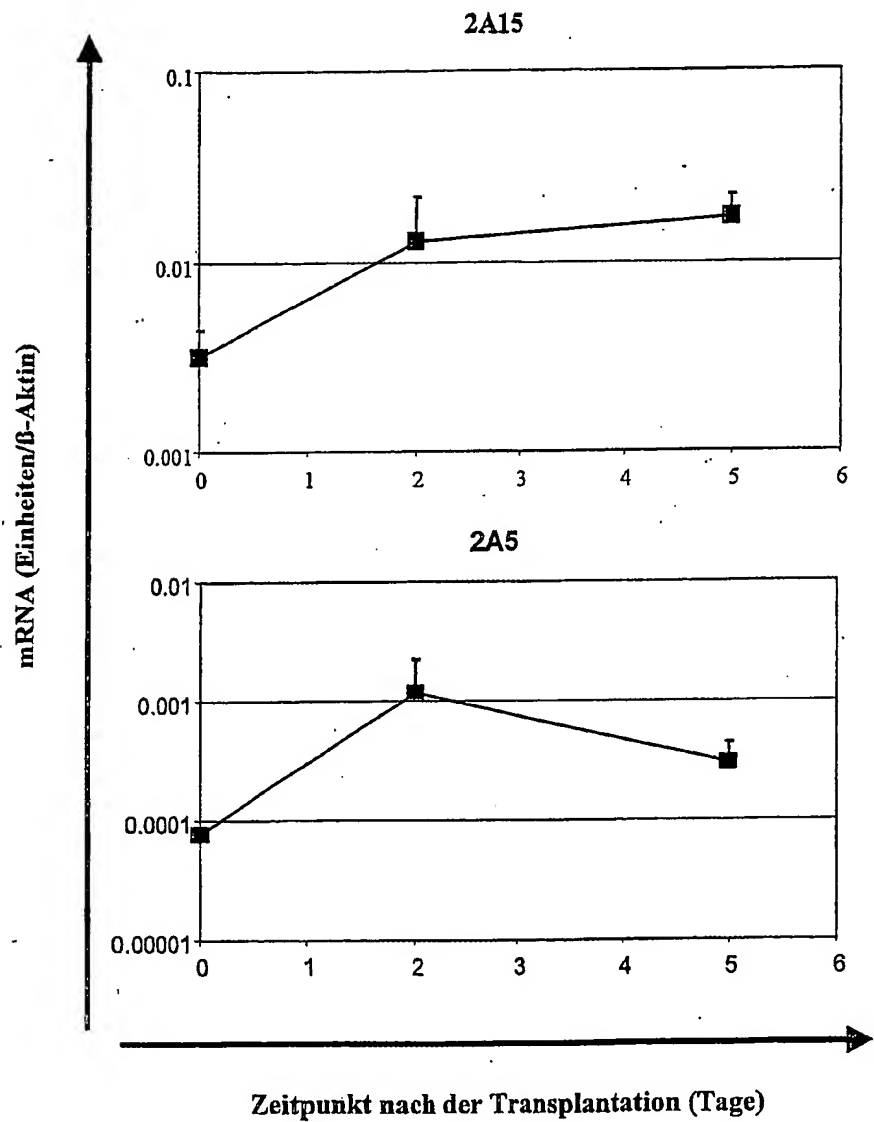


Abb. 5

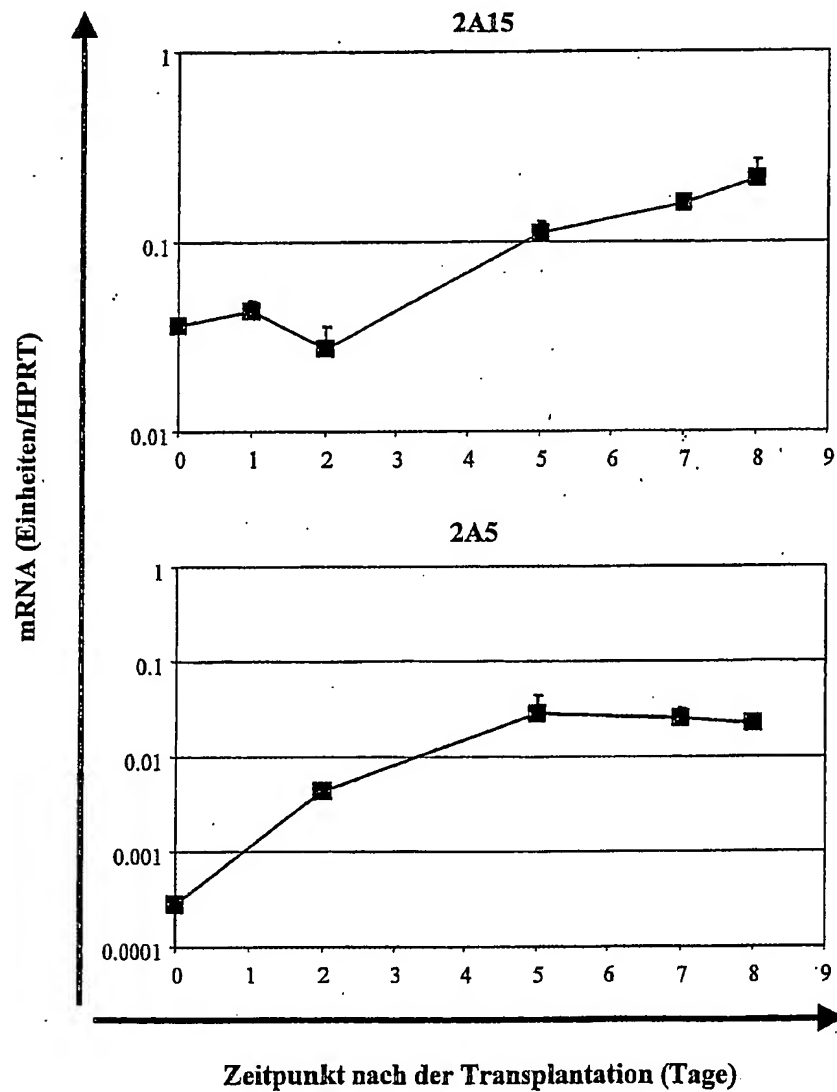


Abb. 6